

Adaptives Immun-Repertoire

Entschlüsselung der T-Zell-Antwort des Haushuhns

SIMON FRÜH, THOMAS GÖBEL

VETERINÄRWISSENSCHAFTLICHES DEPARTMENT, LMU MÜNCHEN

Chickens are an important species in veterinary sciences and a valuable immunological model. T cells are essential for adaptive immunity and memory responses in chickens, playing a crucial role in safeguarding poultry health. Next Generation Sequencing of T cell receptors (TCR repertoire sequencing) has emerged as a powerful tool to better characterize T cell responses. Here, we discuss approaches, applications, and findings regarding TCR repertoire sequencing in chickens.

DOI: 10.1007/s12268-024-2264-0
© The Author(s) 2024

■ Das aviäre Immunsystem mit dem Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) als einer veterinärwissenschaftlich bedeutenden Spezies ist einzigartig. Im Vergleich zum Säugerimmunsystem bilden Hühner beispielsweise keine klassischen Lymphknoten aus, also jene histologisch-anatomischen Strukturen, die durch Zusammenführung von Lymphe und den Immunzellen der Zirkulation die Begegnung von adaptiven Immunzellen (B- und T-Zellen) mit (Fremd-)Antigenen begünstigen. Als weiteres Beispiel werden B-Zellen beim Huhn nicht im Knochenmark gebildet, sondern in einem dezidierten B-Zell-Organ, der Bursa Fabricii. Dennoch ähneln sich die grundsätzlichen immunologischen Funktionen und Immunkomponenten von Säugern und Hühnern stark. In der Vergangenheit wurden, gerade durch die Unterschiede zu anderen Spezies, bedeutende Beiträge zur Immunologie im Hühnermodell gewonnen. So konnte, begünstigt durch die organspezifische Segregation sich entwickelnder B-Zellen, zum ersten Mal bei Hühnern gezeigt werden, dass die Antikörperproduktion von den aus der Bursa Fabricii stammenden B-Zellen abhängt [1, 2]. Für uns und andere Veterinärimmunologen ist die Erforschung der Immunabwehr bei Hühnern neben dem Ziel des immunologischen Erkenntnisgewinnes auch aus tiergesundheitlichen und wirtschaftlichen Gründen von

großer Bedeutung, denn das Huhn ist eines der wichtigsten Nutztiere weltweit.

Die T-Zell-Antwort

T-Zellen sind essenzielle Abwehrzellen, die in der zellvermittelten Immunantwort gegen infizierte oder tumoröse Zellen eine zentrale Rolle einnehmen und für die Bildung von hochaffinen Antikörpern und immunologischem Gedächtnis nötig sind. Aufgrund eines Mangels an effektiven Therapien ist für viele bedeutende veterinärmedizinische Pathogene, z. B. das Virus der Infektiösen Bursitis oder dem Erreger der Marek-Krankheit bei Hühnern, die vorbeugende Vakzinierung und damit die Verhinderung einer klinischen Erkrankung die einzig wirksame Prophylaxe. Das entscheidende Ziel einer Vakzinierung ist hierbei das Initiieren einer T-Zell-abhängigen protektiven Gedächtnisantwort.

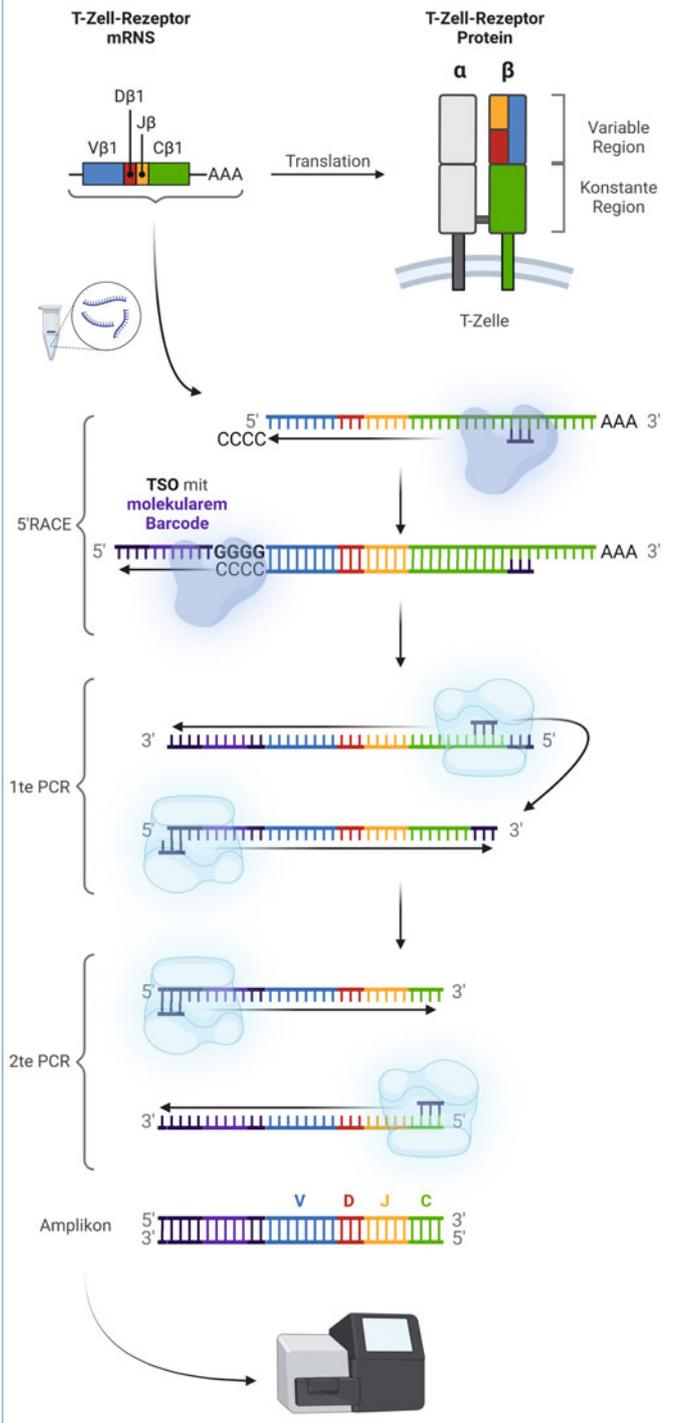
Bei Säugern und beim Huhn koexistieren zwei T-Zell-Hauptpopulationen, $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen, die sich in der Art des T-Zell-Rezeptors (TZR, entweder aus einer α - und einer β -Kette, oder aus einer γ - und einer δ -Kette) und damit auch in ihrer Funktion unterscheiden (**Abb. 1**). Mit den variablen Regionen des TZR (**Abb. 1**) werden Fremdmoleküle (Antigene) spezifisch erkannt, die der T-Zelle in der Regel auf Haupthistokompatibilitätskomplexen präsentiert werden. Die sehr diversen variablen Regionen sind bei naiven (nicht

aktivierten) T-Zellen von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Somit existieren vor Erstkontakt in einem Organismus nur sehr wenige T-Zellen, die spezifisch auf ein potenzielles Antigen reagieren können. Nur in ihrer Gesamtheit erkennen die T-Zellen in einem Organismus (fast) alle potenziellen Fremdmoleküle. Erst nach Aktivierung einer T-Zelle durch Antigenkontakt teilt sich die Zelle klonal. Hierdurch wird die Zahl antigenspezifischer T-Zellen mit identischem TZR erhöht, wodurch der Erreger spezifisch im gesamten Organismus bekämpft werden kann. Die im Verlauf einer Erstreaktion entstehenden Gedächtnis-T-Zellen initiieren bei erneutem Kontakt mit dem Erreger eine gezielte und schnelle Immunabwehr.

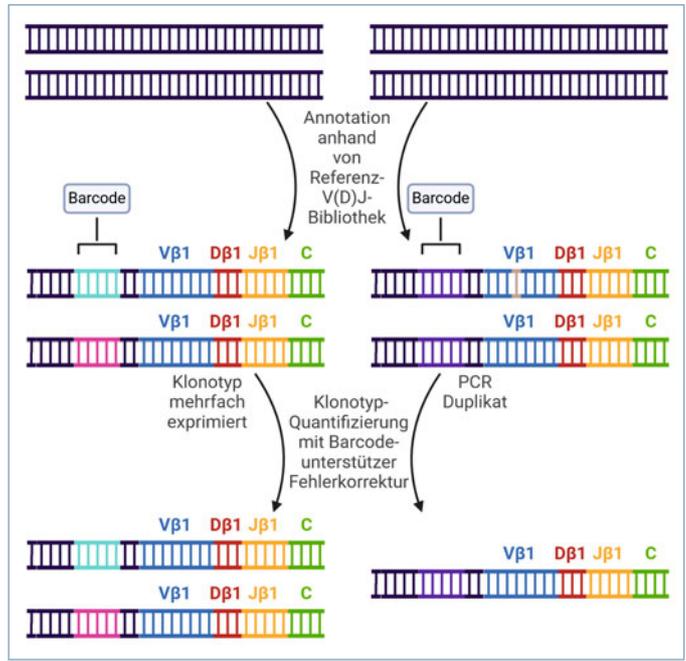
Diese T-Zell-Biologie ermöglicht es, dass bei bekannten TZR auf vorhergehende T-Zell-Immunantworten in dem untersuchten Organismus, beispielsweise die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen, Rückschlüsse gezogen werden können. Die Bestimmung der TZR auf Ebene der Nukleinsäuren ist bedeutend einfacher als die Analyse von TZR-Proteinen. Die Auswertung der Sequenzen basiert auf Klonotypen, einzigartige TZR-Nukleotidsequenzen, die wiederum ursprünglich auf einzigartige naive T-Zellen zurückgeführt werden können.

Die Entschlüsselung des TZR-Repertoires mittels Hochdurchsatzsequenzierung

Die entscheidende Technologie, die es in den vergangenen Jahrzehnten ermöglichte, annähernd die Vielfalt aller T-Zellen in einem Organismus abzubilden, basiert auf der gezielten Amplifikation der TZR und die Sequenzierung der Amplikons mittels Hochdurchsatzsequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS). Die extreme Komplexität der variablen Regionen birgt hierbei Herausforderungen. Diese Diversität wird durch einen Vorgang namens *gene rearrangement* während der Reifung der T-Zellen im Thymus aus komplexen Multi-Gen-Regionen im Genom kreiert. Dabei werden aus repetitiven Genfragmenten vom Typ *Variable (V)*, *Diver-*



◀ **Abb. 1:** Sequenzierung des T-Zell-Rezeptor(TZR)-Repertoires. **Oberes Panel:** Darstellung eines αβ-TZR mit Variable (V)-, Diversity (D)-, Joining (J)- und Constant-(C) Gensequenzen exemplarisch anhand einer β-Kette. **Mittleres und unteres Panel:** Zusammenfassung der Schritte zur Isolation und Amplifikation der TZR-Nukleinsäuren für die Library-Erstellung und Hochdurchsatzsequenzierung. Gesamt-RNA wird aus Geweben oder Zellen isoliert. Anschließend wird die messenger(m)RNA in complementary(c)DNA-Erststränge mit integrierten Barcodes über *template switch oligonucleotides* (TSO) und C-spezifische Primer umgeschrieben. Die TZR-Sequenzen werden in zwei aufeinanderfolgenden PCRs amplifiziert, aufgereinigt und dann sequenziert. 5'RACE: 5' rapid amplification of cDNA ends. Erstellt mit BioRender.com. Die Abbildung wird unter der Lizenz CC BY NC-ND 4.0 veröffentlicht, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>.



▲ **Abb. 2:** Annotation und Quantifizierung von TZR-Klonotypen. Schematische Darstellung der Annotation von TZR-Sequenzen anhand einer Bibliothek, die alle Genfragmente in der Keimbahn-Konfiguration enthält. Identische TZR-Klonotypen stammen bei gleichem Barcode (violett) vom selben RNA-Molekül ab und werden zu einer Konsensus-Sequenz kombiniert. Dabei werden PCR-Fehler (hellbraun) korrigiert. Erstellt mit BioRender.com. Die Abbildung wird unter der Lizenz CC BY NC-ND 4.0 veröffentlicht, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>.

sity (D) und Joining (J) in einer sich entwickelnden T-Zelle pro Kette je ein Genfragment jeden Typs (Typ D nur bei β- und δ-Ketten) ausgewählt und zur variablen Region kombiniert. Die Schnittstelle ist entscheidend für antigen-spezifische Erkennung und wird als Komplementaritätsbestimmende Region 3 (CDR3) bezeichnet.

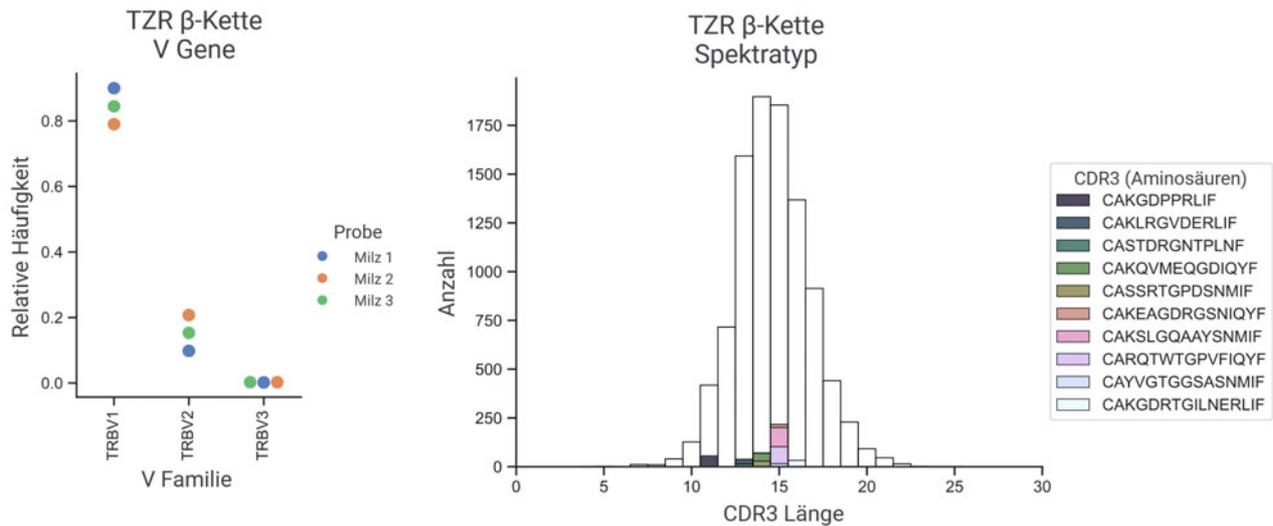
Aufgrund dieser Vielfalt werden TZR häufig aus RNA durch eine 5' rapid amplification of cDNA ends (5' RACE)-PCR amplifiziert (Abb. 1, [3]). Dafür werden lediglich Rückwärts-Primer spezifisch für die konstante Region (C) des TZR benötigt, die bei allen T-Zellen einer Kette identisch ist (Abb. 1).

Die Umschreibung in komplementäre DNA erfolgt durch Template-verlängernde Reverse Transkriptasen mit *template switch oligonucleotides* (TSO). Häufig enthalten die TSO molekulare Barcodes, die komplementär in den Erststrang integriert werden und somit eine verbesserte PCR-Fehlerkorrektur und Quantifizierung ermöglichen (Abb. 1 und Abb. 2, [4]). Die Erststränge werden mittels C-spezifischen Primern amplifiziert. Die resultierenden PCR-Amplikons werden per NGS sequenziert und bioinformatisch auf Ebene der Klonotypen annotiert (Abb. 2). Hierbei wird die TZR-Sequenz mit den wahr-

scheinlichsten V(D)J-Sequenzen aus der Keimbahn verglichen, wodurch die Prozesse der TZR-Reifung und Diversifizierung nachvollzogen werden können. Abhängig von der biologischen Fragestellung ergeben sich zahlreiche Auswertungsmöglichkeiten, wie beispielsweise der Vergleich von V(D)J-Genfrequenzen und Klonotyp-Häufigkeiten in Vergleichsgruppen [5].

Erkenntnisse über das T-Zell-Repertoire des Haushuhns aus unserer Arbeit

Initial wurde von uns die Annotation der V(D)J-Genfragmente in der Keimbahn aktua-



▲ Abb. 3: TZR- β -Ketten-Sequenzen in der Milz von Haushühnern. **Linkes Panel:** Die typische Verteilung zeigt ungleichmäßig exprimierte V-Genfragmente. Dabei wurden zum Zwecke der Aggregation die V-Genfragmente aufgrund ihrer Ähnlichkeit in V-Genfamilien gruppiert. **Rechtes Panel:** Spektraltypen der CDR3-Sequenzen (= Histogramm von CDR3-Längen) mit den 10 häufigsten Klonotypen farblich markiert. Die annähernde Normalverteilung mit nur moderat expandierten Klonotypen deutet auf ein insgesamt naives TZR-Repertoire hin. Bearbeitet mit BioRender.com. Die Abbildung wird unter der Lizenz CC BY NC-ND 4.0 veröffentlicht, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>.

lisiert und vervollständigt [6]. Aus insgesamt 282 TZR-codierenden Genfragmenten wurde eine Referenzbibliothek erstellt, die zur automatisierten Annotation der variablen Regionen der $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZR-Sequenzen mit dem Immunrezeptor-Analyseprogramm MiXCR genutzt werden kann [7]. Darüber hinaus etablierten wir hühnerspezifische Primer für die Amplifikation von TZR-Sequenzen aller vier Ketten.

Ähnlich wie bei anderen Spezies fanden wir bei der Untersuchung des TZR-Repertoires aus der Milz von gesunden Hühnern eine spezifische Hintergrundverteilung, die sich durch das gehäufte Vorkommen bestimmter V(D)J-Genfragmenten auszeichnet (**Abb. 3**). In der Gesamtbetrachtung ähnelte das TZR-Repertoire in Milzproben jedoch einem naiven TZR-Repertoire mit annähernd normalverteilten Spektraltypen (**Abb. 3**).

Ferner nutzen wir die TZR-Repertoire Technologie derzeit, um verschiedene biologische Fragestellungen zu beantworten. Wir untersuchen die Veränderungen des TZR-Repertoires in Reaktion auf Impfungen und Infektionen. Unser Fokus liegt auf der Erkennung von erregerspezifischen TZR-Klonotypen und der Charakterisierung der Dynamik und Lokalisation der T-Zell-Antwort. Dies eröffnet wichtige Anwendungsmöglichkeiten, denn potenziell können damit neue Vakzin-Kandidaten auf die Induktion einer protektiven T-Zell-Antwort evaluiert werden. Weiterhin nutzen wir TZR-Analysen zur besseren Charakterisierung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Biologie, beispielsweise bei der Beschrei-

bung neuer $\gamma\delta$ -T-Zell-bindender Antikörper, bei der Entwicklung von Zellkulturansätzen für $\gamma\delta$ -T-Zellen [8], und um die Verteilung und Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen in Hühnern zu bestimmen. ■

Literatur

- [1] Glick B, Chang TS, Jaap RG (1956) The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poultry Science* 35: 224–225
- [2] Cooper MD, Peterson RDA, Good RA (1965) Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* 205: 143–146
- [3] Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456
- [4] Rosati E, Dowds CM, Liaskou E et al. (2017) Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. *BMC Biotechnology* 17: 61
- [5] Valkiers S, de Vrij N, Gielis S et al. (2022) Recent advances in T-cell receptor repertoire analysis: Bridging the gap with multimodal single-cell RNA sequencing. *Immuninformatics* 5: 100009
- [6] Früh SP, Früh MA, Käufer BB, Göbel TW (2024) Unraveling the chicken T cell repertoire with enhanced genome annotation. *Front Immunol* 15: 1359169

- [7] Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I et al. (2015) MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods* 12: 380–381
- [8] Linti AE, Göbel TW, Früh SP (2024) Chicken $\gamma\delta$ T cells proliferate upon IL-2 and IL-12 treatment and show a restricted receptor repertoire in cell culture. *Front Immunol* 15: 1325024

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel
 LMU München
 Institut für Tierphysiologie
 Veterinärstraße 13
 D-80539 München
 goebel@lmu.de

AUTOREN



Simon Früh

2008–2010 Biologiestudium an der LMU München. 2010–2016 Studium der Veterinärmedizin an der LMU München mit anschließender Promotion bis 2021 an der Cornell University in Ithaca, NY, USA. Seit 2021 PostDoc an der FU Berlin und der LMU München im Rahmen der DFG-Forschungsgruppe „ImmunoChick“.



Thomas Göbel

1983–1988 Studium der Veterinärmedizin an der LMU München mit anschließender Promotion bis 1991. 1992–1994 PostDoc an der University of Alabama, Birmingham, USA, in bei Prof. Dr. M.D. Cooper. 1995–1999 Wissenschaftler am Basel Institut für Immunologie, Schweiz. Seit 2000 Assistent und seit 2003 Professor für Veterinärimmunologie an der LMU München.